

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

1c551 U.S. PTO  
09/156580



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年 8月 7日

出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第224852号

出 願 人  
Applicant(s):

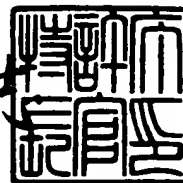
農林水産省農業生物資源研究所長

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

1998年 8月28日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

山 佐 建 志



出証番号 出証特平10-3068624

【書類名】 特許願

【整理番号】 J198412287

【提出日】 平成10年 8月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 ペチュニアの転写因子 P e t S P L 2 の遺伝子の導入によって花序の節間を短縮させる方法

【請求項の数】 9

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 2   農林水産省   農業生物資源研究所内

    【氏名】 高辻 博志

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 2   農林水産省   農業生物資源研究所内

    【氏名】 中川 仁

【特許出願人】

    【識別番号】 591127076

    【氏名又は名称】 農林水産省農業生物資源研究所長 桂 直樹

【代理人】

    【識別番号】 100078282

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 山本 秀策

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 888888

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ペチュニアの転写因子 Pet SPL 2 の遺伝子の導入によって花序の節間を短縮させる方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (a) または (b) の DNA を含む遺伝子：

(a) 配列番号 1 によって示される塩基配列の第 190 位から第 807 位までの塩基配列を有する DNA；または

(b) (a) の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ植物の形質を変化させ得る転写因子をコードする DNA。

【請求項 2】 以下の (i) または (ii) の転写因子をコードする遺伝子：

(i) 配列番号 2 によって示されるアミノ酸配列の第 1 位から第 206 位までのアミノ酸配列を含む転写因子；または

(ii) アミノ酸配列 (i) において、1 またはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ植物の形質を変化させ得る転写因子。

【請求項 3】 前記植物の形質が、植物の高さおよび節間の長さからなる群より選択される、請求項 1 または 2 に記載の遺伝子。

【請求項 4】 請求項 1 から 3 のいずれか 1 つに記載の遺伝子を植物細胞に導入する工程、および該遺伝子が導入された植物細胞を植物体に再生する工程を包含する、植物の形質が変化した植物を作出する方法。

【請求項 5】 前記植物が双子葉植物である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 前記植物がナス科植物である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 前記植物がペチュニア属植物である、請求項 6 に記載の方法。

。

【請求項 8】 前記遺伝子が植物発現ベクターに組み込まれている、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】 請求項 4 から 8 のいずれか 1 つに記載の方法により作出された、植物の形質が変化した植物。

【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、植物の形質を変化させ得る転写因子をコードする遺伝子およびその利用に関する。本発明は、特に、ペチュニア由来の新規遺伝子であるPetSPL2遺伝子、およびその関連遺伝子、ならびにそれらの利用に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

植物の形質、例えば、花の形態形成の制御機構を解明するため、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、キンギョソウ(*Antirrhinum majus*)、およびペチュニア(*Petunia hybrida*)などを用いて、分子生物学的および分子遺伝学的に研究が行われている。特に、ペチュニアは、研究材料として好んで使用されている。その理由として、ペチュニアは、園芸植物として価値が高く多種多様な品種が存在すること、形質転換し易いこと、花が大きくて見やすいこと、および遺伝学的な知見の蓄積が豊富であることが挙げられる(高辻博志、「植物の形を決める分子機構」、細胞工学、植物細胞工学シリーズ(秀潤社)、96~106頁)。

## 【0003】

上記の植物の花の器官が変化した突然変異体から、その変異の原因となる遺伝子が単離されている。その結果、花の分化および形態形成の制御には、転写因子が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。例えば、シロイヌナズナのSUPERMANは、DNA結合ドメインとしてジンクフィンガーモチーフを有する転写因子である。その遺伝子に変異が生じているSUPERMAN変異体では、雄しべの数が著しく増加し、雌しべが退化することが知られている(遺伝、1997年4月号(51巻4号)、34~38頁)。

## 【0004】

植物の形質の制御に関与する新規な転写因子を同定することは、その制御の機構を理解するために重要である。遺伝子工学的手法を用いれば、花の形態形成などを制御する転写因子の遺伝子を植物に導入することができる。遺伝子導入により、従来の交配による手法では得られないか、または得ることが困難である新規な形質を花を有する植物に付与できる可能性がある。このような新規な形質を有

する植物は、園芸上の価値が高いと考えられる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記課題の解決を意図するものである。本発明の目的は、植物の形質、特に植物の高さおよび節間の長さを変化させ得る転写因子をコードする遺伝子を提供することにある。本発明の他の目的は、遺伝子の導入により植物の形質が変化した植物を作出する方法を提供することにある。本発明のさらなる目的は、植物の形質が変化した植物を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明は、以下の (a) または (b) のDNAを含む遺伝子に関する：

(a) 配列番号1によって示される塩基配列の第190位から第807位までの塩基配列を有するDNA；または

(b) (a) の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ植物の形質を変化させ得る転写因子をコードするDNA。

【0007】

本発明はまた、以下の (i) または (ii) の転写因子をコードする遺伝子に関する：

(i) 配列番号2によって示されるアミノ酸配列の第1位から第206位までのアミノ酸配列を含む転写因子；または

(ii) アミノ酸配列 (i) において、1またはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ植物の形質を変化させ得る転写因子。

【0008】

1つの実施態様においては、上記の植物の形質は、植物の高さおよび節間の長さからなる群より選択される。

【0009】

本発明はさらに、上記の遺伝子のいずれかを植物細胞に導入する工程、およびこの遺伝子が導入された植物細胞を植物体に再生する工程を含む、植物の形質が

変化した植物を作出する方法に関する。

【0010】

1つの実施態様においては、上記の植物は双子葉植物である。好ましくは、双子葉植物はナス科植物であり、より好ましくは、ペチュニア属植物である。

【0011】

1つの実施態様においては、上記の遺伝子は植物発現ベクターに組み込まれている。

【0012】

本発明はさらに、上記の方法のいずれか1つに記載の方法により作出された、植物の形質が変化した植物に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳しく説明する。

【0014】

「転写因子」は、遺伝子の調節領域のDNAに結合してmRNAの合成を制御するタンパク質をいう。ある種の転写因子は、そのDNA結合ドメインにジンクフィンガーモチーフと呼ばれる保存性の高いアミノ酸配列を有することが知られている。

【0015】

本発明の遺伝子は、植物の形質を変化させ得る転写因子をコードする遺伝子である。この遺伝子は、以下のDNAのいずれかを含み得る：

(a) 配列番号1によって示される塩基配列の第190位から第807位までの塩基配列を有するDNA；および

(b) (a)の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ植物の形質を変化させ得る転写因子をコードするDNA。

【0016】

好ましくは、本発明の遺伝子は(a)のDNAを含み得る。

【0017】

本発明の遺伝子はまた、以下の転写因子のいずれかをコードし得る：

(i) 配列番号2によって示されるアミノ酸配列の第1位から第206位までの

アミノ酸配列を含む転写因子；および

(ii) アミノ酸配列 (i) において、1 またはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ植物の形質を変化させ得る転写因子。

【0018】

好ましくは、上記の遺伝子は (i) の転写因子をコードし得る。

【0019】

本発明において特に好ましい遺伝子は、PetSPL2遺伝子である。この遺伝子のcDNA配列（配列番号1）および推定アミノ酸配列（配列番号2）を図1に示す。

【0020】

「植物の形質」の変化とは、植物の形態の少なくとも1つについての任意の変化をいう。植物の形態は、好ましくは植物の高さおよび節間の長さの少なくとも一方であるが、これらに限定はされない。この変化は、本発明の遺伝子を導入して得られた植物の形質を、遺伝子導入前の植物（野生種または園芸品種）の形質と比較することにより評価される。

【0021】

変化した植物の高さとしては、矮性および半矮性などが挙げられるが、これらに限定はされない。矮性は、好ましくは、遺伝子導入前の植物の標準的な高さの約1/2以下、より好ましくは約1/3以下の高さをいう。

【0022】

変化した節間の長さとしては、節間の短縮が挙げられるが、これに限定はされない。節間の短縮には、生殖枝の節間（すなわち花序）および栄養枝の節間（すなわち葉序）のいずれの短縮も含まれる。花序の短縮は、特に好ましい変化の例である。節間の長さの変化は、好ましくは、遺伝子導入前の植物の標準的な節間と比較して約1/2以下、より好ましくは約1/5以下、さらにより好ましくは約1/10以下の短縮である。

【0023】

変化した植物の形質は、より好ましくは矮性と節間の短縮との組合せであり、さらに好ましくは矮性と花序の短縮との組合せである。



## 【0024】

本発明の遺伝子は、例えば、公知の転写因子の遺伝子によりコードされるアミノ酸配列の保存領域に対応するデジェネレートプライマー対を用いて、植物のゲノミックDNAを鋳型としてPCRを行い、その後、得られた増幅DNA断片をプローブとして用いて同じ植物のゲノミックライブラリーをスクリーニングすることにより単離され得る。そのようなプライマー対の例として、5'-CARGCNYTNGGNGNCAY-3'（配列番号3）または5'-YTNGGNGNCAYATGAAY-3'（配列番号4）と5'-ARNCKNARYTCNARRTC-3'（配列番号5）との組合せが挙げられる。ここで、Nはイノシンであり、RはGまたはAであり、YはCまたはTであり、そしてKはTまたはGである。

## 【0025】

PCRは、市販のキットおよび装置の製造者の指針に基づいて行うか、当業者に周知の手法で行い得る。遺伝子ライブラリーの作製法、プローブとのハイブリダイゼーションに使用するストリンジェントな条件、および遺伝子のクローニング法も当業者に周知である。例えば、マニアティスらのMolecular Cloning, A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) を参照のこと。

## 【0026】

得られた遺伝子の塩基配列は、当該分野で公知のヌクレオチド配列解析法または市販されている自動シーケンサーにより決定し得る。

## 【0027】

本発明の遺伝子は、天然から単離されたものに限定されず、合成ポリヌクレオチドも含み得る。合成ポリヌクレオチドは、例えば、上記のようにして配列決定された遺伝子を、当業者に周知の手法によって改変することにより入手し得る。

## 【0028】

本発明の遺伝子は、当業者に周知の方法を用いて、適切な植物発現ベクターに連結され、公知の遺伝子組換え技術により、植物細胞に導入され得る。導入された遺伝子は、植物細胞中のDNAに組み込まれて存在する。なお、植物細胞中のDNAとは、染色体のみならず、植物細胞中に含まれる各種オルガネラ（例えば、ミトコンドリア、葉緑体など）に含まれるDNAを含む。

## 【0029】

「植物」は、単子葉植物および双子葉植物のいずれも含む。好ましい植物は、双子葉植物である。双子葉植物は、離弁花亜綱および合弁花亜綱のいずれも含む。好ましい亜綱は、合弁花亜綱である。合弁花亜綱は、リンドウ目、ナス目、シソ目、アワゴケ目、オオバコ目、キキョウ目、ゴマノハグサ目、アカネ目、マツムシソウ目、およびキク目のいずれも含む。好ましい目は、ナス目である。ナス目は、ナス科、ハゼリソウ科、ハナシノブ科、ネナシカズラ科、およびヒルガオ科のいずれも含む。好ましい科は、ナス科である。ナス科は、ペチュニア属、チョウセンアサガオ属、タバコ属、ナス属、トマト属、トウガラシ属、ホオズキ属、およびクコ属などを含む。好ましい属は、ペチュニア属、チョウセンアサガオ属、およびタバコ属であり、より好ましくは、ペチュニア属である。ペチュニア属は、*P.hybrida*種、*P.axillaris*種、*P.inflata*種、および*P.violacea*種などを含む。好ましい種は、*P.hybrida*種である。「植物」は、特に他で示さない限り、花および/または果実を有する植物体および植物体から得られる種子を意味する。「植物細胞」の例としては、葉および根などの植物器官の細胞、カルスならびに懸濁培養細胞が挙げられる。

## 【0030】

「植物発現ベクター」は、本発明の遺伝子の発現を調節するプロモーターなどの種々の調節エレメントが宿主植物の細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。好適には、植物遺伝子プロモーター、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子、およびエンハンサーを含み得る。発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。本発明に用いる植物発現ベクターは、さらにT-DNA領域を有し得る。T-DNA領域は、特にアグロバクテリウムを用いて植物を形質転換する場合に遺伝子の導入の効率を高める。

## 【0031】

「植物遺伝子プロモーター」は、植物で発現するプロモーターを意味する。構成的プロモーター、および花を含む植物体の一部において選択的に発現するプロモーターが好ましい。プロモーターの例としては、カリフラワーモザイクウイルス

ス(CaMV)の35Sプロモーター、およびノパリン合成酵素のプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0032】

「ターミネーター」は、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、およびポリA配列の付加に関与する配列である。ターミネーターは、mRNAの安定性に寄与し、そして遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。ターミネーターの例としては、CaMV35Sターミネーター、およびノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター(Tnos)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

「薬剤耐性遺伝子」は、形質転換植物の選抜を容易にするものであることが望ましい。カナマイシン耐性を付与するためのネオマイシンフォスフトランスフェラーゼII(NPTII)遺伝子、およびハイグロマイシン耐性を付与するためのハイグロマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子などが好適に用いられ得るが、これらに限定されない。

【0034】

「エンハンサー」は、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ得る。エンハンサーとしては、CaMV35Sプロモーター内の上流側の配列を含むエンハンサー領域が好適である。エンハンサーは、1つの植物発現ベクターあたり複数個用いられ得る。

【0035】

本発明における植物発現ベクターは、当業者に周知の遺伝子組換え技術を用いて作製され得る。植物発現ベクターの構築には、例えば、pBI系のベクターまたはpUC系のベクターが好適に用いられるが、これらに限定されない。

【0036】

植物細胞への植物発現ベクターの導入には、当業者に周知の方法、例えば、アグロバクテリウムを介する方法、および直接細胞に導入する方法が用いられ得る。アグロバクテリウムを介する方法としては、例えば、Nagelらの方法(Microbio 1. Lett., 67, 325(1990))が用いられ得る。この方法は、まず、植物発現ベクタ

ーで（例えば、エレクトロポレーションによって）アグロバクテリウムを形質転換し、次いで、形質転換されたアグロバクテリウムをリーフディスク法等の周知の方法により植物細胞に導入する方法である。植物発現ベクターを直接細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法、パーティクルガン、リン酸カルシウム法、およびポリエチレングリコール法などがある。これらの方法は、当該分野において周知であり、形質転換する植物に適した方法が、当業者により適宜選択され得る。

#### 【0037】

植物発現ベクターを導入された細胞は、例えば、カナマイシン耐性などの薬剤耐性を基準として選択される。選択された細胞は、常法により植物体に再生され得る。

#### 【0038】

再生した植物体においては、当業者に周知の手法を用いて、導入された本発明の遺伝子の発現を確認し得る。この確認は、例えば、ノーザンブロット解析を用いて行い得る。具体的には、植物の葉から全RNAを抽出し、変性アガロースでの電気泳動の後、適切なメンブランにブロットする。このブロットに、導入遺伝子の一部分と相補的な標識したRNAプローブをハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子のmRNAを検出し得る。

#### 【0039】

本発明の植物は、上記の手法によって作出された、植物の形質が変化した形質転換植物である。変化した植物の形質（すなわち、植物の高さおよび/または節間の長さ）は、公知の野生種または園芸品種には存在しない形質であることが好ましい。また、変化した植物の形質は、園芸上価値の高い形質であることが好ましい。さらに、変化した植物の形質は、得られた植物の子孫にわたって、安定に保持されることが好ましい。

#### 【0040】

##### 【実施例】

以下に実施例を挙げて、本発明を具体的に説明する。この実施例で使用した制限酵素、プラスミドなどは、商業的な供給源から入手可能である。

## 【0041】

## (実施例1: PetSPL2遺伝子の単離)

シロイヌナズナのSUPERMAN遺伝子にコードされるタンパク質と、大豆の根粒に特異的に発現するGmN479遺伝子(河内ら、私信)にコードされるタンパク質とを比較した。両タンパク質に共通に存在するアミノ酸配列に基づいてPCRに用いるデジェネレート・プライマーを3種類作成した。遺伝子の5'側から3'側に向かう二つのプライマーの塩基配列は、それぞれ5'-CARGCNYTNGGNGGNCAAY-3'(プライマー1、アミノ酸配列QALGGHに対応する; 配列番号3) および5'-YTNGGNGGNCA YATGAAY-3'(プライマー2、アミノ酸配列LGGHMNに対応する; 配列番号4)であり、3'側から5'側に向かうプライマーの塩基配列は5'-ARNCKNARYTCNARRTC-3'(プライマー3、アミノ酸配列DLELRLに対応する; 配列番号5)である。ここで、Nはイノシンであり、YはCまたはTであり、RはGまたはAであり、そしてKはTまたはGである。

## 【0042】

Boutry, M. and Chua N.H. (1985) EMBO J. 4, 2159-2165に記載の方法に従って抽出したペチュニア (*Petunia hybrida* var. Mitchell) のゲノミックDNAを鋳型とし、プライマー1およびプライマー3を用いて、94℃/10分の後、94℃/30秒、50℃/30秒、72℃/60秒を30サイクルした後、72℃/7分の条件で第一のPCRを行った。さらに第一のPCR産物の一部を鋳型にし、プライマー2およびプライマー3を用いて第二のPCRを行った(反応条件は第一のPCRと同じ)。増幅されたDNA断片をTAクローニングベクター(Invitrogen製)に挿入し、常法に従って大腸菌に導入した。形質転換された大腸菌からプラスミドを抽出し、DNA塩基配列を決定した。その結果、得られたDNA断片においては、SUPERMANおよびGmN479に共通に含まれるジンクフィンガーモチーフの一部がコードされていることがわかった。このDNA断片が由来した遺伝子を、PetSPL2遺伝子と名付けた。なお、この実験において、PetSPL2と類似の塩基配列を含む3つの他のDNA (PetSPL1、3および4遺伝子) の存在が示された。PetSPL3遺伝子については、同一出願人による特願平10-65921を参照。

## 【0043】

PetSPL2遺伝子のcDNAをクローニングするために、上記のDNA断片およびGENETR AP cDNA selection kit(BRL社製)を用いて、pSPORTプラスミドベクター(BRL社製)中に作製されたペチュニア (*Petunia hybrida* var. Mitchell) の花のつぼみのcDNAライブラリー (BRL社製キットによる) をスクリーニングし、数個のクローンを得た。このようにして、ペチュニア由来のPetSPL2遺伝子のcDNAを単離した。

#### 【0044】

(実施例2: PetSPL2遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の解析)

実施例1で得られたクローンのうち最長のクローンに含まれる約1.0kbのPetSPL2遺伝子cDNA断片のDNA塩基配列を決定した(配列番号1)。得られたDNA塩基配列に含まれるオープンリーディングフレームから、タンパク質アミノ酸配列を推定した(配列番号2)。

#### 【0045】

塩基配列の解析により、PetSPL2遺伝子は、SUPERMAN遺伝子、PetSPL1遺伝子、およびPetSPL4遺伝子に対して、それぞれ、58%、67%、および51%の塩基配列相同性を示した。PetSPL2遺伝子とPetSPL3遺伝子とは、25%の塩基配列相同性を示した。なお、塩基配列の解析は、各遺伝子のコード領域のみで行った。

#### 【0046】

アミノ酸配列解析の結果、PetSPL2は、SUPERMANと類似のTFIIIAタイプのジンクフィンガーモチーフを1個含んでいた。このことから、PetSPL2は転写因子であることが推定された。PetSPL2は、SUPERMANおよびPetSPL3に対して、全アミノ酸配列レベルで、それぞれ37%および23%の相同性を示した。

#### 【0047】

表1は、SUPERMANおよび各PetSPLのジンクフィンガーモチーフにおけるアミノ酸配列を比較する。ジンクフィンガーモチーフにおける、PetSPL2のSUPERMANに対するアミノ酸配列相同性(約100%)は、PetSPL1のSUPERMANに対する対応する相同性(約100%)と同じであり、PetSPL3のSUPERMANに対する対応する相同性(約76%)と比較して高いことが示された(ここで、ジンクフィンガーモチーフを表1の4番目のCから24番目のHまでとして、アミノ酸配列相同性を計算した)

。表1はまた、SUPERMANおよび各PetSPLのC末端疎水性領域の比較を示す。

【 0 0 4 8 】

【表 1】

Zinc-finger	C-terminal hydrophobic region
SUPERMAN	ILRNDEII SLELEIGL INESEQDL DLELRGFA
PetSPL1	LMKRSEFLRLELGIGMINESKEDLDLELRGYT
PetSPL2	VIKKSEFLRLDLGIGLISESKEDLDLELRGST
PetSPL3	GVSDSRENRLPARNQETTPFYAELDLELRGHE
PetSPL4	CGTLDEKPKRQAENNDMQQDDSKLDLELRGPD

上記の結果から、PetSPL2は、PetSPL3とは別のクラスに属し、よりSUPERMANに類縁性の高い新規な転写因子であることが推定される。

【 0 0 4 9 】

(実施例 3 : PetSPL2をコードするポリヌクレオチドを含む植物発現ベクターの構築)

プラスミドpBI221 (Clontechから購入) 中のCaMV 35Sプロモーターを含むDNA断片 (HindIII-XbaI断片) およびNOSターミネーターを含むDNA断片 (SacI-EcoRI断片) を順次プラスミドpUCAP (van Engelen, F.A.ら、Transgenic Res.4:288-290(1995)) のマルチクローニングサイトに挿入し、pUCAP35Sを作製した。一方、PetSPL2を含むpSPORT/PetSPL2プラスミドをKpnIサイトおよびSacIサイト (ベクター中のサイト) で切断し、pUCAP35SのKpnIおよびSacIサイトの間に挿入した。さらにこの組換えプラスミドをAscIおよびPacIで切断し、PetSPL2をコードするDNA断片を、バイナリーベクターpBINPLUS (van Engelen, F.A.ら、(1995), 前出) のAscIおよびPacIサイトに導入した。

## 【0050】

構築されたPetSPL2遺伝子高発現ベクター (pBIN-35S-PetSPL2) は、図2に示されるように、CaMV 35Sプロモーター領域 (P35S; 0.9kb)、本発明のPetSPL2をコードするポリヌクレオチド (PetSPL2; 1.0kb)、およびノパリン合成酵素のターミネーター領域 (Tnos; 0.3kb) を含んで構成されている。図2のPnosは、ノパリン合成酵素のプロモーター領域、NPTIIはネオマイシンホスホトランスフェラーゼII遺伝子を示す。LBおよびRBは、それぞれT-DNA left borderおよびT-DNA right borderを示す。

## 【0051】

(実施例4: PetSPL2遺伝子のペチュニア細胞への導入)

## (1) (アグロバクテリウム・チュメファシエンスの形質転換)

アグロバクテリウム・チュメファシエンスLBA4404株 (Clontechから購入) を250  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンと50  $\mu$ g/mlのリファンピシンを含むL培地中、28℃で培養した。Nagelら (1990) (前出) の方法に従って、この菌株の細胞懸濁液を調製した。実施例3で構築したPetSPL2遺伝子高発現ベクターを、エレクトロポレーションにより、上記菌株に導入した。

## 【0052】

## (2) (PetSPL2をコードするポリヌクレオチドのペチュニア細胞への導入)

上記(1)で得られたアグロバクテリウム・チュメファシエンスLBA4404株を、YEB培地 (D.M.Glover編、DNA Cloning, IPL PRESS, 第2巻、78頁) で振とう培養



(28℃, 200rpm) した後、滅菌水で20倍に希釈した。この希釈液中で、ペチュニア (*Petunia hybrida* var. Mitchell) の葉片と共存培養した。2～3日後、カルベニシリンを含む培地で上記細菌を除去し、その後、この葉片を2週間ごとに選択培地で継代培養した。上記PetSPL2遺伝子と共に導入されたpBINPLUS由来のNPT II遺伝子発現によるカナマイシン抵抗性を指標として、形質転換されたペチュニア細胞を選抜した。常法により、形質転換細胞からカルスを誘導した後、植物体に再分化した。

#### 【0053】

(実施例 5 : PetSPL2形質転換植物におけるPetSPL2遺伝子の発現)

実施例 4 で得られたPetSPL2形質転換ペチュニア13個体の葉から、全RNAを抽出した。抽出物10  $\mu$ gずつを変性アガロース電気泳動によって展開し、常法に従ってGenescreen plusフィルター (Dupont製) にブロッティングした。DIG RNAラベリングキット (Boehringer Mannheim製) を用いて標識したPetSPL2アンチセンスRNAを用い、キットの指示に従ってハイブリダイゼーションおよびフィルターの洗浄を行った。洗浄後、フィルターをXARフィルム (Kodak製) に常温で1時間露光した。図 3 は、13個体からのPetSPL2遺伝子mRNAを検出した変性アガロースゲル電気泳動像のフルオログラムを示す。独立の形質転換ペチュニア13個体のうち、4個体が高発現プロモーターによる制御によってPetSPL2mRNAを高レベルに発現していることが示された。

#### 【0054】

(実施例 6 : PetSPL2遺伝子を高レベルに発現する形質転換ペチュニアの表現型)

PetSPL2遺伝子を高レベルに発現する4個体の独立の形質転換ペチュニアのうち、比較的発現レベルが低い1個体を除く3個体において、以下のような共通した表現型が観察された。植物体に見られる最も顕著な変化は、花序の節間の短縮 (節間伸長の抑制) およびそれに伴う矮化である (図 4、左はPetSPL2形質転換ペチュニア、右は野生型ペチュニアを示す)。この変化は、栄養成長期よりも生殖成長期 (花序) においてより顕著に表れた。花序の節間の長さは、野生型の十分の一以下になることが示された (図 5、左は野生型ペチュニアの節間、右はPe

tSPL2形質転換ペチュニアの節間を示す)。その他、葉が丸みを帯び、花が少し小さいなどの変化が見られた(図4)。

【0055】

花序の節間伸長の制御に関与する遺伝子としてはシロイヌナズナのERECTA遺伝子が報告されている(Toriiら、1996、Plant Cell, 8:735)。しかし、ERECTA遺伝子と本発明のPetSPL2遺伝子との間には、塩基配列レベルでもアミノ酸配列レベルでも有意な相同性は認められない。植物ホルモンの合成やその制御に関与する遺伝子の中にも節間を短縮させる遺伝子(rolAなど)が知られている。しかし、これらの植物ホルモン関連遺伝子は、節間伸長の制御以外に多面的効果を示すことが知られている(Dehioら、1993、Plant Mol.Bio.23:1199)。

【0056】

上記の結果から、PetSPL2形質転換ペチュニアは節間の短縮により矮性となる結果、野生型と比較して花姿が大幅に変化することが示された。従って、PetSPL2遺伝子の導入は、特に節間が伸長する傾向のある花卉または園芸品種について有用であることが理解される。花姿の大幅な変化は、植物に新たな鑑賞価値をもたらし得る。また、草丈の抑制は、植物に耐倒伏性を与える点で、大きな園芸上の価値を有し得る。さらに、PetSPL2遺伝子を導入した果樹は、樹形がコンパクトになることが期待される。これは、果実の収穫作業を効率化し得る点で有意義である。

【0057】

【発明の効果】

本発明によれば、植物の形態を変化させ得る転写因子をコードする遺伝子が提供される。この遺伝子を利用することにより、植物の形質が変化した植物を作出し得る。作出された植物には、野生種および園芸品種には存在しないか極めてまれである形質が付与されるため、園芸上有用である。

【0058】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; National Institute of Agrobiological Resoueces, Mi

<120> Method for Shorting Internode of Inflorescence by  
Introducing Gene for Petunia transcription factor  
PetSPL2

&lt;130&gt; sequence1

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP

&lt;151&gt; 1998-08-07

&lt;160&gt; 5

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 997

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Petunia hybrida var.Mitchell

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (190)..(807)

&lt;400&gt; 1

```

cccagtgccat ttttttctct ctagtcaagc tctctatatc atcatcacta ttcccttggc 60
tgcagtaaca ctccctattta accctcacaa aaaaattacc agagggcagc aaaaaatgct 120
tgaacataat tattatactt actattaagc tagatttcct cttgatcttg ctagggttga 180
ctggagaaa atg gca ggc atg gat aga aac agt ttc aac agt aag tac ttc 231
      Met Ala Gly Met Asp Arg Asn Ser Phe Asn Ser Lys Tyr Phe
          1             5             10
aaa aac aaa agc atc atg gca aga cag atg gag tac ttg aat aac aac 279
Lys Asn Lys Ser Ile Met Ala Arg Gln Met Glu Tyr Leu Asn Asn Asn
    15             20             25             30
aat ggc gac aat aac aac aac aat aat gtt aca agc tca tta cga gat 327
Asn Gly Asp Asn Asn Asn Asn Asn Asn Val Thr Ser Ser Leu Arg Asp
          35             40             45
aat tat gga aat gaa gat cat tta ctt ggt gga cta ttc tct tgg cct 375
Asn Tyr Gly Asn Glu Asp His Leu Leu Gly Gly Leu Phe Ser Trp Pro
          50             55             60
cca aga tct tat aca tgt agc ttt tgt aaa agg gaa ttt aga tct gct 423
Pro Arg Ser Tyr Thr Cys Ser Phe Cys Lys Arg Glu Phe Arg Ser Ala
          65             70             75
caa gct ctt ggt gga cac atg aat gtt cat aga aga gat aga gcc att 471
Gln Ala Leu Gly Gly His Met Asn Val His Arg Arg Asp Arg Ala Ile
          80             85             90
ttg aga caa tca cca cct aga gat att aat agg tat tct ctt cta aac 519
Leu Arg Gln Ser Pro Pro Arg Asp Ile Asn Arg Tyr Ser Leu Leu Asn
          95             100             105             110
ctt aat ctt gaa cca aac cct aac ttt tac cct agt cat aac cct agt 567
Leu Asn Leu Glu Pro Asn Pro Asn Phe Tyr Pro Ser His Asn Pro Ser
          115             120             125
ttt tca aga aaa ttc cca cct ttt gaa atg agg aaa tta gga aaa gga 615
Phe Ser Arg Lys Phe Pro Pro Phe Glu Met Arg Lys Leu Gly Lys Gly
          130             135             140

```

gtt gtt cca aac aat cac ttg aaa agt gcc aga ggg cgt ttt gga gtt 663  
Val Val Pro Asn Asn His Leu Lys Ser Ala Arg Gly Arg Phe Gly Val  
145 150 155  
gag aaa att gac tct ttc atg caa gaa aaa gaa tgt act act aca gtg 711  
Glu Lys Ile Asp Ser Phe Met Gln Glu Lys Glu Cys Thr Thr Thr Val  
160 165 170  
atc aag aag tcc gag ttt cta aga ttg gac ttg gga att ggg ttg atc 759  
Ile Lys Lys Ser Glu Phe Leu Arg Leu Asp Leu Gly Ile Gly Leu Ile  
175 180 185 190  
agt gaa tca aag gaa gat tta gat ctt gaa ctt cga ctg gga tcc act 807  
Ser Glu Ser Lys Glu Asp Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Gly Ser Thr

195 200 205  
taactatattc taattttttac ggcattaagg tttgttaaatt gagtcgacag cttagtcaaa 867  
actacttatg cactttaata tggcttcttg tgctatatatt atttatittta catggctgta 927  
tctaggtttg cattttaaga ttttagtacct tgtcagatta aaagaaaacg aaagttaaatt 987  
taaaaaaaaaa 997

<210> 2

<211> 206

<212> PRT

<213> Petunia hybrida var.Mitchell

<400> 2

Met Ala Gly Met Asp Arg Asn Ser Phe Asn Ser Lys Tyr Phe Lys Asn  
1 5 10 15  
Lys Ser Ile Met Ala Arg Gln Met Glu Tyr Leu Asn Asn Asn Asn Gly  
20 25 30  
Asp Asn Asn Asn Asn Asn Val Thr Ser Ser Leu Arg Asp Asn Tyr  
35 40 45  
Gly Asn Glu Asp His Leu Leu Gly Gly Leu Phe Ser Trp Pro Pro Arg  
50 55 60  
Ser Tyr Thr Cys Ser Phe Cys Lys Arg Glu Phe Arg Ser Ala Gln Ala  
65 70 75 80  
Leu Gly Gly His Met Asn Val His Arg Arg Asp Arg Ala Ile Leu Arg  
85 90 95  
Gln Ser Pro Pro Arg Asp Ile Asn Arg Tyr Ser Leu Leu Asn Leu Asn  
100 105 110  
Leu Glu Pro Asn Pro Asn Phe Tyr Pro Ser His Asn Pro Ser Phe Ser  
115 120 125  
Arg Lys Phe Pro Pro Phe Glu Met Arg Lys Leu Gly Lys Gly Val Val  
130 135 140  
Pro Asn Asn His Leu Lys Ser Ala Arg Gly Arg Phe Gly Val Glu Lys  
145 150 155 160  
Ile Asp Ser Phe Met Gln Glu Lys Glu Cys Thr Thr Thr Val Ile Lys  
165 170 175  
Lys Ser Glu Phe Leu Arg Leu Asp Leu Gly Ile Gly Leu Ile Ser Glu  
180 185 190  
Ser Lys Glu Asp Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Gly Ser Thr  
195 200 205

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<220>

<221> modified\_base

<222> (6)

<223> i  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (12)  
 <223> i  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (15)  
 <223> i  
 <400> 3  
 cargcnytng gnggncay 18  
 <210> 4  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:primer  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (3)  
 <223> i  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (6)  
 <223> i  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (9)  
 <223> i  
 <400> 4  
 ytnggnggnc ayatgaay 18  
 <210> 5  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:primer  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (3)  
 <223> i  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (6)  
 <223> i  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (12)  
 <223> i  
 <400> 5  
 arncknaryt cnarrtc 17

【図面の簡単な説明】

【図 1】 PetSPL2遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列を示す。

【図 2】 PetSPL2遺伝子高発現ベクター (pBIN-35S-PetSPL2) の概略を示す。

【図 3】 PetSPL2形質転換ペチュニアにおいてPetSPL2遺伝子のmRNAを検出した変性アガロースゲル電気泳動像のフルオログラムを示す。

【図 4】 (左) PetSPL2形質転換ペチュニアの植物体と (右) 野生型ペチュニアの植物体とを撮影した生物の形態を示す写真を示す。

【図 5】 (左) 野生型ペチュニアの節間と (右) PetSPL2形質転換ペチュニアの節間を撮影した生物の形態を示す写真を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

```

CCCAGTGCCA TTTTTTCTCT CTAGTCAAGC TCTCTATATC ATCATCACTA TTCCCTTGGC

TGCAGTAACA CTCCTATTTA ACCCTCACAA AAAAATTACC AGAGGGCAGC AAAAAATGCT

TGAACATAAT TATTATACTT ACTATTAAGC TAGATTTCCCT CTTGATCTTG CTAGGTTTGA

CTGGAGAAAA TGGCAGGCAT GGATAGAAAC AGTTTCAACA GTAAGTACTT CAAAAACAAA
      M   A   G   M   D   R   N   S   F   N   S   K   Y   F   K   N   K

AGCATCATGG CAAGACAGAT GGAGTACTTG AATAACAACA ATGGCGACAA TAACAACAAC
S   I   M   A   R   Q   M   E   Y   L   N   N   N   N   G   D   N   N   N   N

AATAATGTTA CAAGCTCATT ACGAGATAAT TATGGAAATG AAGATCATTT ACTTGGTGGA
N   N   V   T   S   S   L   R   D   N   Y   G   N   E   D   H   L   L   G   G

CTATTCTCTT GGCCTCCAAG ATCTTATACA TGTAGCTTTT GTAAAAGGGA ATTTAGATCT
L   F   S   W   P   P   R   S   Y   T   C   S   F   C   K   R   E   F   R   S

GCTCAAGCTC TTGGTGGACA CATGAATGTT CATAGAAGAG ATAGAGCCAT TTTGAGACAA
A   Q   A   L   G   G   H   M   N   V   H   R   R   D   R   A   I   L   R   Q

TCACCACCTA GAGATATTAA TAGGTATTCT CTTCTAAACC TTAATCTTGA ACCAAACCCT
S   P   P   R   D   I   N   R   Y   S   L   L   N   L   N   L   E   P   N   P

AACTTTTACC CTAGTCATAA CCCTAGTTTT TCAAGAAAAT TCCCACCTTT TGAAATGAGG
N   F   Y   P   S   H   N   P   S   F   S   R   K   F   P   P   F   E   M   R

AAATTAGGAA AAGGAGTTGT TCCAAACAAT CACTTGAAAA GTGCCAGAGG GCGTTTTGGA
K   L   G   K   G   V   V   P   N   N   H   L   K   S   A   R   G   R   F   G

GTTGAGAAAA TTGACTCTTT CATGCAAGAA AAAGAATGTA CTA CTACAGT GATCAAGAAG
V   E   K   I   D   S   F   M   Q   E   K   E   C   T   T   T   V   I   K   K

TCCGAGTTTC TAAGATTGGA CTTGGGAATT GGGTTGATCA GTGAATCAAA GGAAGATTTA
S   E   F   L   R   L   D   L   G   I   G   L   I   S   E   S   K   E   D   L

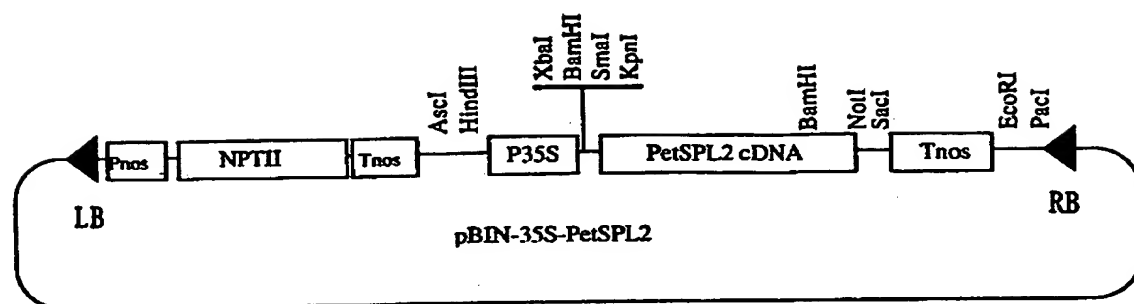
GATCTTGAAC TTCGACTGGG ATCCACTTAA CTATATCTAA TTTTACGGC ATTAAGGTTT
D   L   E   L   R   L   G   S   T

GTAAATTGAG TCGACAGCTT AGTCAAAACT ACTTATGCAC TTTAATATGG CTTCTTGTGC

TATATTTATT TATTTTACAT GGCTGTATCT AGGTTTGCAT TTTAAGATTT AGTACCTTGT

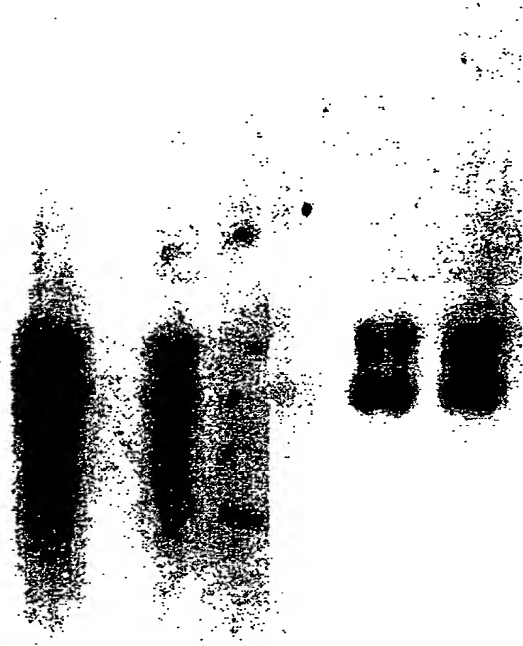
CAGATTAAAA GAAAACGAAA GTTAAATTAA AAAAAAA
    
```

【図 2】



【図 3】

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13





【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】植物の形質、特に植物の高さおよび節間の長さを変化させ得る転写因子をコードする遺伝子、当該遺伝子の導入により植物の形質が変化した植物を作出する方法、および当該方法により作出された植物を提供する。

【解決手段】

以下の（a）または（b）のDNAを含む遺伝子：

（a）配列番号1によって示される塩基配列の第190位から第807位までの塩基配列を有するDNA；または

（b）（a）の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ植物の形質を変化させ得る転写因子をコードするDNA。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591127076]

1. 変更年月日	1991年 5月16日
[変更理由]	新規登録
住 所	茨城県つくば市観音台2丁目1の2
氏 名	農林水産省農業生物資源研究所長